

· 论 著 ·

不同耐药表型肺炎克雷伯菌生物膜形成能力与 RyhB 基因的关联性*

熊流新¹, 陆丽苗¹, 梁启兰¹, 黄志伟¹, 李淑英¹, 盘国雄¹, 钟建辉¹, 陈亚宽²

广东省肇庆市第二人民医院: 1. 检验科; 2. 呼吸科, 广东肇庆 526060

摘要:目的 探讨呼吸道感染分离的不同耐药表型肺炎克雷伯菌(KP)生物膜形成能力与 RyhB 基因的相关性及其临床意义。**方法** 收集 2018 年 10 月 2019 年 10 月该院呼吸道感染分离的 46 株 KP, 检测菌株的耐药性, 构建 KP 体外感染模型并通过结晶紫染色法定量检测 KP 生物膜形成能力; 采用 PCR 法扩增 RyhB 基因。**结果** 46 株 KP 根据耐药谱分为 4 个耐药表型, 耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌(CRKP) 6 株(占 13.0%), 产超广谱 β-内酰胺酶肺炎克雷伯菌(ESBLsKP) 18 株(占 39.1%), 多重耐药肺炎克雷伯菌(MDRKP) 13 株(占 28.3%), 高毒力肺炎克雷伯菌(HvKP) 9 株(占 19.6%)。科室来源排名前 3 为重症监护室 11 株(占 23.9%), 呼吸科 8 株(占 17.4%), 神经外科 7 株(占 15.2%)。CRKP 生物膜形成能力低于产 ESBLsKP、MDRKP($P < 0.05$); HvKP 生物膜形成能力低于产 ESBLsKP、MDRKP($P < 0.05$); CRKP 与 HvKP 生物膜形成能力比较差异无统计学意义($P = 0.802$); 产 ESBLsKP 与 MDRKP 生物膜形成能力比较差异无统计学意义($P = 0.466$)。产 ESBLsKP 和 MDRKP 存在特异性条带, CRKP 和 HvKP 不存在特异性条带。不同耐药表型与 RyhB 基因表达的交互作用与生物膜形成能力有关, 且 RyhB 基因阴性表达时, 会导致生物膜形成能力下降。**结论** 该院的产 ESBLsKP 和 MDRKP 有较强的生物膜形成能力并容易携带 RyhB 基因, RyhB 基因正调控 KP 生物膜的合成。

关键词: 肺炎克雷伯菌; 生物膜; 耐药表型; RyhB 基因

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2021.07.018

中图法分类号: R446.5

文章编号: 1673-4130(2021)07-0844-05

文献标志码: A

Correlation between RyhB gene and biofilm formation ability of Klebsiella pneumoniae with different drug-resistant phenotypes*

XIONG Liuxin¹, LU Limiao¹, LIANG Qilan¹, HUANG Zhiwei¹, LI Shuying¹,
PAN Guoxiong¹, ZHONG Jianhui¹, CHEN Yakuan²

1. Department of Clinical Laboratory; 2. Department of Respiratory, the Second People's Hospital of Zhaoqing, Zhaoqing, Guangdong 526060, China

Abstract: Objective To investigate the relationship between the biofilm formation ability of Klebsiella pneumoniae (KP) and the RyhB gene of different drug-resistant phenotypes isolated from respiratory tract infection and its clinical significance. **Methods** A total of 46 KP strains isolated from respiratory tract infections in this hospital were collected from October 2018 October 2019, the drug resistance of the strains were detected; KP in vitro infection model was constructed and the KP biofilm formation ability was quantitatively detected by crystal violet staining; the RyhB gene was amplified by PCR. **Results** A total of 46 KP strains were divided into 4 drug-resistant phenotypes based on the drug resistance spectrum, and 6 strains of carbapenemase-resistant Klebsiella pneumoniae (CRKP), accounted for 13.0%; 18 strains of extended-spectrum β-lactamase-producing Klebsiella pneumoniae (ESBLsKP), accounted for 39.1%; 13 strains of multi-drug resistant Klebsiella pneumoniae (MDRKP), accounted for 28.3%; 9 strains of highly virulent Klebsiella pneumoniae (HvKP), accounted for 19.6%. The top 3 department sources were intensive care unit (11 strains, accounted for 23.9%), respiratory (8 strains, accounted for 17.4%), and neurosurgery (7 strains, accounted for 15.2%). HvKP biofilm formation ability was lower than ESBLsKP and MDRKP ($P < 0.05$); CRKP and HvKP biofilm formation ability were not statistically different ($P = 0.802$); ESBLsKP and MDRKP biofilm formation ability were not statistically different ($P = 0.466$). There were specific bands in ESBLsKP and

* 基金项目: 肇庆市科技创新指导类项目(201804031431)。

作者简介: 熊流新, 男, 副主任技师, 从事病原微生物分子致病机制相关研究。

本文引用格式: 熊流新, 陆丽苗, 梁启兰, 等. 不同耐药表型肺炎克雷伯菌生物膜形成能力与 RyhB 基因的关联性[J]. 国际检验医学杂志,

MDRKP, but there were no specific bands in CRKP and HvKP. The interaction between different drug resistance phenotypes and RyhB gene expression was related to the biofilm formation ability, and when the RyhB gene was negatively expressed, it would cause the biofilm formation ability to decrease. **Conclusion** The ES-*BLs*KP and MDRKP of the hospital have strong biofilm formation ability and are easy to carry RyhB gene. RyhB gene positively regulates the synthesis of KP biofilm.

Key words: *Klebsiella pneumoniae*; biofilm; drug-resistant phenotype; RyhB gene

肺炎克雷伯菌(KP)是引起医院内感染和社区感染的重要条件致病菌,可导致多个系统尤其是呼吸系统感染^[1]。高毒力肺炎克雷伯菌(HvKP)的特征为高黏性、拉丝试验阳性,可导致社区型肺炎,感染人群主要为青壮年^[2]。随着三代头孢的广泛使用,KP的耐药率逐年上升,且出现了产超广谱 β -内酰胺酶肺炎克雷伯菌(ESBLsKP)、多重耐药肺炎克雷伯菌(MDRKP)和耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌(CRKP),这类KP引起的呼吸道感染已成为临床关注的热点^[3-4]。研究表明自然界中绝大多数细菌可以产生生物膜,其细胞外基质参与细菌的黏附、定植过程,生物膜包含的大量黏性基质能形成物理屏障,限制抗菌药物和炎症细胞的有效杀伤,生物膜的形成与KP的耐药性和致病性密切相关^[5-6]。RyhB基因属于非编码小RNA,研究表明RyhB可以被转录但不能被直接翻译为蛋白,可通过影响细菌生物膜的合成来调节和影响细菌致病性^[7-8]。本研究通过分析本院呼吸道感染分离的46株KP的耐药性和生物膜形成能力,同时检测RyhB基因,探讨不同耐药表型KP生物膜形成能力与RyhB基因的相关性及其临床意义。

1 材料与方 法

1.1 菌株来源 收集本院2018年10月至2019年10月不同耐药表型的46株KP(剔除同一患者的重复菌株),对其进行细菌培养、分离和纯化,根据脉冲场凝胶电泳(PFGE)试验,剔除型别相似度 $>85\%$ 的菌株。

1.2 仪器与试剂 Biofosun微生物鉴定药敏系统、数字显示比浊仪购自上海复星公司;超净工作台购自苏州安泰公司;实时荧光定量PCR(qPCR)仪购自美国Bio-Rad公司;多功能微孔板检测仪购自美国Bio-Tek公司;qPCR试剂盒购自日本Takara公司;细菌总RNA提取试剂盒购自北京天根生化科技有限公司;液体LB培养基和血平板购自广州迪景公司;结晶紫购自美国Sigma公司;96孔聚苯乙烯灭菌板购自美国Corning公司;RNA引物购自上海生工公司;质控菌株肺炎克雷伯菌ATCC700603和大肠埃希菌ATCC25922均购自广东省临床检验中心。

1.3 药敏方法与分组 采用Biofosun微生物鉴定药敏系统进行细菌鉴定并使用配套药敏板测定18种抗菌药物的最小抑菌浓度,依据美国临床和实验室标准协会M100-S27药敏折点判读结果。KP耐药分组参考苏乐斌等^[9]的研究,根据抗菌药物的不同耐药谱将

菌株分为4个耐药表型。具体分组方法如下:用接种环轻触血平板过夜培养的新鲜菌落并向外牵拉,重复2次,若2次均有黏液丝生成并且长度 >5 mm为拉丝试验阳性,判断为HvKP;按标准纸片扩散法同时使用头孢噻肟、头孢他啶、头孢噻肟/克拉维酸、头孢他啶/克拉维酸,任一药敏纸片加克拉维酸与不加克拉维酸抑菌环直径之差 >5 mm,判断为产ESBLsKP;对亚胺培南耐药菌株,参考文献[8]进行改良碳青霉烯酶灭活(mCIM)试验,结果阳性判读为CRKP;对3类或以上抗菌药物耐药,不同于HvKP、产ESBLsKP、CRKP分组标准的菌株归类为MDRKP。

1.4 KP生物膜形成能力的检测 采用96孔聚苯乙烯灭菌板构建KP感染模型,通过结晶紫染色法定量4种不同耐药表型的吸光度(A),具体方法参考文献[10]进行。(1)将46株KP转种血平板,挑取单个菌落于LB培养基中35℃培养24 h;(2)吸取10 μ L至LB培养基中进行传代培养后把菌液调至0.5麦氏浊度,将10 μ L菌液接种于含190 μ L LB培养液的96孔聚苯乙烯灭菌板(每株设3个复孔),设置未加菌液的LB培养基为空白对照;(3)35℃培养48 h后分离上清液,加入200 μ L 1%结晶紫染色液染色20 min,采用ddH₂O缓慢冲去未结合结晶紫,每孔加200 μ L无水乙醇溶解后采用酶标仪测定590 nm处A值(平行测定3次,取平均值);(4)结果判读标准: A_c 等于空白孔平均A值加其3倍标准差,当 $A_{\#} \leq A_c$ 时,结果为阴性无生物膜产生;当 $A_c < A_{\#} \leq 2 \times A_c$ 时,结果为弱阳性;当 $2 \times A_c < A_{\#} \leq 4 \times A_c$ 时结果为中等阳性;当 $A_{\#} > 4 \times A_c$ 时结果为强阳性。

1.5 qPCR扩增RyhB基因 依照细菌总RNA提取试剂盒使用说明书提取RNA作为模板。参考文献[11]设计RyhB基因引物序列(GT44:5'-GGA TCC GCA AGG GTC TCC CTG-3',GT45:5'-AGA TCT CGG TTC AGC ATG GCG TAT C-3')和设定PCR反应条件。qPCR扩增RyhB基因过程具体如下:将RNA模板、引物、 $2 \times$ qPCR buffer、Taq Mix溶解后冰上备用,反应体系为25 μ L: $2 \times$ qPCR buffer 12.5 μ L,正义引物1 μ L,反义引物1 μ L,RNA模板1 μ L,Taq Mix 0.5 μ L,ddH₂O加至25 μ L。震荡混匀后短暂离心使溶液收集至管底,将热循环仪预热至45℃,qPCR反应条件为:反转录温度45℃,30 min;95℃预变性2 min;94℃变性30 s,58℃退火30 s,72℃延伸30 s,35个循环;72℃延伸5 min。qPCR产物经

10 g/L 琼脂糖凝胶电泳鉴定,阳性产物送上海生工生物工程有限公司进行测序,测序结果在美国国家生物信息中心(NCBI)数据库进行比对分析。

1.6 统计学处理 使用 SPSS23.0 软件进行数据处理分析。对数据进行正态性检验,计量资料多组间比较采用单因素方差分析,两两比较使用 LSD-*t* 检验;计数资料以例数和百分率表示,组间比较采用 χ^2 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 KP 的耐药表型分组及临床分布 46 株 KP 根据不同的耐药谱特征可分为 4 个耐药表型,其中 CRKP 6 株(占 13.0%),产 ESBLsKP 18 株(占 39.1%),MDRKP 13 株(占 28.3%),HvKP 9 株(占 19.6%)。46 株 KP 科室来源排名前 3 为重症监护室(ICU)11 株(占 23.9%),呼吸科 8 株(占 17.4%),神经外科 7 株(占 15.2%),见表 1。

表 1 46 株 KP 的科室分布

科室	菌株(n)	构成比(%)	科室	菌株(n)	构成比(%)
ICU	11	23.9	肿瘤科	3	6.5
呼吸科	8	17.4	神经内科	2	4.3
神经外科	7	15.2	康复科	1	2.2
新生儿科	6	13.1	妇科	1	2.2
普儿科	3	6.5	CCU	1	2.2
普外科	3	6.5			

注:CCU 为冠状动脉粥样硬化性心脏病监护室。

2.2 4 种不同耐药表型 KP 生物膜形成能力差异分析 5 株 CRKP 为弱阳性、1 株 CRKP 为中等阳性,9 株 HvKP 生物膜形成能力均为弱阳性,18 株产 ESBLsKP 生物膜形成能力均为中等阳性,13 株 MDRKP 生物膜形成能力均为中等阳性。不同组别的生物膜形成能力差异有统计学意义($F = 38.444$, $P < 0.05$),CRKP 生物膜形成能力低于产 ESBLsKP、MDRKP($P < 0.05$);HvKP 生物膜形成能力低于产 ESBLsKP、MDRKP($P < 0.05$);CRKP 与 HvKP 比较,差异无统计学意义($P = 0.802$);产 ESBLsKP 与 MDRKP 比较,差异无统计学意义($P = 0.466$)。见表 2。

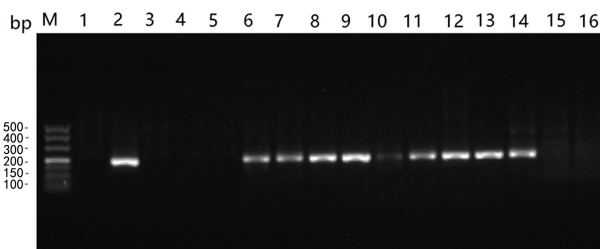
2.3 4 种不同耐药表型 KP 的 RyhB 基因扩增电泳结果分析 产 ESBLsKP 和 MDRKP 存在特异性条带(大小约 200 bp),CRKP 和 HvKP 不存在特异性条带。qPCR 扩增 RyhB 基因的阳性产物经测序后在 NCBI 数据库进行比对分析,结果一致,大小为约 200 bp,其中包含了完整的 RyhB 基因编码区(91 bp)位于 yhhY 和虚拟蛋白 ORF 之间。见图 1。

2.4 RyhB 基因表达与 KP 生物膜形成能力关联性分析 以生物膜形成能力为因变量,以组别与基因表达情况的交互项(共 4 项,其中以组别 = MDRKP ×

RyhB 基因表达 = 阳性为参照层级,其他层级均与此层级进行层内的比较,得出偏回归系数 β),建立广义线性回归方程,偏回归系数 β 用来表示关联程度。对组别 = CRKP × RyhB 基因表达 = 阴性,检验 $P < 0.05$,说明此交互层级对生物膜形成能力的影响有统计学意义, $\beta = -0.059$,说明当组别为 CRKP 且基因表达阴性时,生物膜形成能力相对于参照层平均下降了 0.059 个单位,生物膜形成能力呈负向关联;对组别 = HvKP × RyhB 基因表达 = 阴性,检验 $P < 0.05$,说明此交互层级对生物膜形成能力的影响有统计学意义, $\beta = -0.057$,说明当组别为 HvKP 且基因表达阴性时,生物膜形成能力相对于参照层平均下降了 0.057 个单位,与生物膜形成能力呈负向关联;对组别 = 产 ESBLsKP × RyhB 基因表达 = 阳性,检验 $P > 0.05$,说明此交互层级对生物膜形成能力的影响无统计学意义。结果表明,在 CRKP 及 HvKP 菌株中,RyhB 基因表达为阴性,其与其他组别基因表达为阳性比较,生物膜形成能力会下降;不同耐药表型与 RyhB 基因表达的交互作用与生物膜形成能力有关($P < 0.05$),且 RyhB 基因阴性表达时,会导致生物膜形成能力下降。见表 3。

表 2 4 种不同耐药表型 KP 生物膜形成能力多重比较

菌株类别	比较菌株	平均值 差值	标准 误差	P	95%CI	
					下限	上限
CRKP	HvKP	-0.002	0.009	0.802	-0.021	0.017
	产 ESBLsKP	-0.063	0.008	0.001	-0.081	-0.047
	MDRKP	-0.059	0.009	0.001	-0.077	-0.041
HvKP	CRKP	0.002	0.009	0.802	-0.017	0.021
	产 ESBLsKP	-0.062	0.007	0.001	-0.076	-0.047
	MDRKP	-0.057	0.008	0.001	-0.072	-0.041
产 ESBLsKP	CRKP	0.063	0.008	0.001	0.047	0.081
	HvKP	0.062	0.007	0.001	0.047	0.076
	MDRKP	0.005	0.007	0.466	-0.008	0.018
MDRKP	CRKP	0.059	0.009	0.001	0.041	0.077
	HvKP	0.057	0.008	0.001	0.041	0.072
	产 ESBLsKP	-0.005	0.007	0.466	-0.018	0.008



注:M 泳道为 DNA marker;1 泳道为阴性对照;2 泳道为阳性对照;3~5 泳道为 CRKP 扩增条带;6~10 泳道为产 ESBLsKP 扩增条带;11~14 泳道为 MDRKP 扩增条带;15~16 泳道为 HvKP 扩增条带。

图 1 RyhB 基因 qPCR 扩增电泳图

表 3 RyhB 基因表达与 KP 生物膜形成能力的广义线性模型

变量	β	标准误差	Wald/ χ^2	自由度	P	95%CI	
						下限	上限
常数项	0.121	0.003 3	1 366.672	1	—	0.115	0.128
组别=CRKP×RyhB 基因表达=阴性	-0.059	0.005 8	102.433	1	<0.001	-0.071	-0.048
组别=HvKP×RyhB 基因表达=阴性	-0.057	0.005 1	122.109	1	<0.001	-0.067	-0.047
组别=产 ESBLsKP×RyhB 基因表达=阳性	0.005	0.004 3	1.279	1	0.258	-0.004	0.013

注:模型似然比 $\chi^2=148.098, P<0.05$, 模型成立;—为该项无数据。

3 讨 论

KP 是呼吸道感染最常见的革兰阴性条件致病菌,极易导致院内感染暴发。根据 2018 年中国细菌耐药监测网结果显示 KP 耐药率呈逐年上升趋势,特别是对碳青霉烯类抗菌药物的耐药率从 2005 年的 3.0% 上升至 2018 年的 27.6%,MDRKP 和 CRKP 引起的抗感染治疗成为临床关注的焦点^[12]。

细菌生物膜由多糖、蛋白质等组成,大量的黏性基质将细菌包裹,常规抗菌药物往往难以穿透作用于该类细菌,导致临床抗菌药物治疗效果差^[13]。本研究收集的 46 株 KP 经过前期的工作,剔除来源同一患者的重复菌株及 PFGE 型别相似度 >85% 的菌株,相比卢鸿等^[10]研究同一克隆菌株的 KP 生物膜形成能力更有临床意义。彭蓉蓉等^[14]研究表明 KP 生物膜的形成在 ICU 发生的概率较高,与本院临床分布主要在 ICU、呼吸科和神经外科的结果一致。本研究通过结晶紫染色法对 4 种不同耐药表型 KP 生物膜形成能力进行定量检测,结果显示,4 种 KP 均存在生物膜形成能力,其中产 ESBLsKP、MDRKP 的生物膜形成能力明显强于 CRKP 和 HvKP ($P<0.05$)。DAVIDO 等^[15]研究显示,产 ESBLsKP 和 MDRKP 是目前医院流行的主要致病菌,这表明生物膜形成能力是适应外界环境的重要方式,产 ESBLsKP 和 MDRKP 具有较强的生物膜形成能力,有利于其在医院内定植及传播,大量临床分离菌株的出现与生物膜形成有密切关系。CRKP 为 4 种不同耐药表型中耐药性最强的菌株,但是生物膜形成能力显示 5 株 CRKP 为弱阳性、1 株 CRKP 为中等阳性,这表明 KP 生物膜形成能力与耐药性关系的具体机制仍有待进一步研究。

非编码小 RNA 基因存在于绝大多数原核生物中,通常位于基因间区,具有特殊的茎环结构,可以被转录但不能被直接翻译为蛋白,通过碱基反向互补调控靶标 mRNA 分子的表达^[16]。细菌在不同温度、营养、酸碱度、铁离子浓度等条件下增殖并适应环境的能力依赖于蛋白质类的调控因子及一些非编码小 RNA 的调控,RyhB 最早是在大肠埃希菌中被发现,属于非编码小 RNA^[17]。肠杆菌科细菌除沙门菌和鼠疫耶尔森同时存在 RyhB1 和 RyhB2 外,绝大多数只有 1 个 RyhB,研究表明,当铁缺乏时 RyhB 通过下调细胞内非必需铁蛋白的合成,RyhB 本身的表达则受

到负调控因子 Fur 的影响以维持体内铁平衡^[18]。KP 的 RyhB 大小为 91 bp,大肠埃希菌的 RyhB 大小为 90 bp,两者之间的同源率为 92.3%,大肠埃希菌 RyhB 基因位于 yhhX 和 yhhY 之间,而 KP 的 RyhB 基因位于 yhhY 和虚拟蛋白 ORF 之间。目前美国临床和实验室标准协会还未制订检测 KP 生物膜形成的标准方法,寻找一种快速、灵敏度和特异度均高的可用于临床标本检测的方法,对生物膜相关性感染的治疗和清除生物膜药物的筛选有十分重要的临床意义。本研究采用 qPCR 法扩增 4 种不同耐药表型 KP 的 RyhB 基因,其中产 ESBLsKP 和 MDRKP 存在特异性条带,CRKP 和 HvKP 不存在特异性条带,通过 RyhB 基因表达与 KP 生物膜形成能力的关联性分析表明,RyhB 基因是影响 KP 生物膜形成的重要调节因子之一。

参考文献

- [1] JIANG L, GREENE M K, INSUA J L, et al. Clearance of intracellular Klebsiella pneumoniae infection using gentamicin-loaded nanoparticles [J]. J Control Release, 2018, 279(1): 316-325.
- [2] 孙巧玲, 舒玲斌, 胡洁, 等. MALDI-TOF MS 技术快速区分携带 rmpA2 毒力基因的高毒力肺炎克雷伯菌 [J]. 中华检验医学杂志, 2018, 41(8): 571-576.
- [3] 江雪银, 黄妹, 陈亚南, 等. 神经内科患者 CRKP 肺部感染的临床特征与影响因素分析 [J]. 中华医院感染学杂志, 2019, 29(19): 2939-2942.
- [4] LUO X F, LIU Y J, QIN Z D, et al. Studies on the antibacterial activity and mechanism of antimicrobial peptides against drug-resistant bacteria [J]. J Biomed Nanotechnol, 2018, 14(3): 601-608.
- [5] BIRARDA G, DELNERI A, LAGATOLLA C, et al. Multi-technique microscopy investigation on bacterial biofilm matrices: a study on Klebsiella pneumoniae clinical strains [J]. Anal Bioanal Chem, 2019, 411(27): 7315-7325.
- [6] DE-SOUSA J K T, HADDAD J P A, DE-OLIVEIRA A C, et al. In vitro activity of antimicrobial-impregnated catheters against biofilms formed by KPC-producing Klebsiella pneumoniae [J]. J Appl Microbiol, 2019, 127(4): 1018-1027.
- [7] KABERDINA A C, RUIZ-LARRABEITI O, SUE L C, et al. Reprogramming of gene expression (下转第 851 页)

反应发生率为 22.45%，与研究报道接近^[19-21]，但高于肱动脉采血组的 8.16% ($P < 0.05$)，并且股动脉采血组采血时间长于肱动脉采血组，采血轻度、重度疼痛感发生率高于肱动脉采血组 ($P < 0.05$)，这些结果提示，肱动脉采血法的整体临床效果明显优于股动脉采血法。因此肱动脉采血法在血容量尚可的临床危急重症患者中是可行的，且具有一定临床应用价值。

参考文献

[1] 高雨晴. 成人动脉采血技术操作进展[J]. 医药前沿, 2018, 8(36): 11-13.

[2] 朱海燕. 三种动脉采血法在血气分析中的应用[J]. 护理实践与研究, 2015, 12(11): 126-127.

[3] 曹慧梅, 李冬梅, 唐爱霞. 600 例动脉采血的成功率和安全性分析[J]. 心血管康复医学杂志, 2015, 24(4): 455-457.

[4] 中华内科杂志社, 中华医学杂志社, 中华消化杂志社, 等. 急性非静脉曲张性上消化道出血诊治指南[J]. 中华消化杂志, 2015, 35(12): 793-798.

[5] 王峰, 刘政, 汪婷婷, 等. 双侧肱动脉干变异一例[J]. 解剖学杂志, 2017, 40(6): 775-776.

[6] 钟华荪. 静脉输液治疗护理学[M]. 北京: 人民军医出版社, 2007: 4-8.

[7] 陈红琴, 朱继先. 实用 ICU 护理手册[M]. 2 版. 北京: 人民军医出版社, 2009: 141-142.

[8] 孙鑫. 不同部位动脉采血进行血气分析的临床效果观察[J]. 中国医药指南, 2017, 15(6): 53.

[9] 李树平. 动脉血气剩余血用于危重患者生化检验的临床应用价值[J]. 临床医学研究与实践, 2017, 2(9): 115-117.

[10] 唐章平. 动脉血气剩余血用于危重患者生化检验的临床应用分析[J]. 国际检验医学杂志, 2017, 38(14): 2005-

2007.

[11] 宋勇. 动脉血气剩余血用于危重患者生化检验的临床应用价值[J/CD]. 现代医学与健康研究电子杂志, 2019, 3(21): 107-108.

[12] 陈红花, 王晓鹏, 严兴海. 三种不同动脉采血法在肺病科应用的临床观察[J]. 中国医药指南, 2013, 11(16): 245-247.

[13] 刘华, 侯宇. 桡动脉采血不同进针角度的穿刺效果评价[J]. 中国校医, 2019, 33(6): 452-453.

[14] 陈莉, 赵兰花, 张兰, 等. 改良桡动脉穿刺法提高新型冠状病毒肺炎病人动脉采血一次穿刺成功率的效果观察[J]. 护理研究, 2020, 34(6): 941-942.

[15] 熊亚芬, 李洁莉. 指尖按压定位法在桡动脉采血中的应用研究[J/CD]. 实用临床护理学电子杂志, 2020, 5(8): 26-30.

[16] 辛晓敏. 桡动脉穿刺法在新生儿采血中的应用[J]. 中国现代药物应用, 2017, 11(4): 191-193.

[17] 兰艳梅, 韦美英, 韦姿宇. 危重患者三个不同部位动脉采血效果观察[J]. 中外医学研究, 2014, 12(4): 95-96.

[18] 童伟勤. 两种动脉采血方法在新生儿血气分析中的比较[J]. 母婴世界, 2019, 19(5): 198-199.

[19] 高正群, 刘春燕. 桡动脉穿刺与股动脉穿刺采血效果比较[J]. 基层医学论坛, 2012, 16(3): 321-322.

[20] 彭燕, 张莉, 赵龙德. 针尖斜面向下穿刺法在新生儿桡动脉置管中的运用[J]. 川北医学院报, 2019, 34(4): 483-485.

[21] 王存英, 倪桂荣. 肱动脉采血在呼吸衰竭患者中的应用体会[J]. 基层医学论坛, 2015, 19(2): 282-283.

(收稿日期: 2020-07-23 修回日期: 2020-11-27)

(上接第 847 页)

in *Escherichia coli* cultured on pyruvate versus glucose [J]. *Mol Genet Genomics*, 2019, 294(5): 1359-1371.

[8] 熊流新, 陆丽苗. 肺炎克雷伯菌临床分布及其碳青霉烯酶基因型检测分析[J]. 中国当代医药, 2019, 26(21): 15-19.

[9] 苏乐斌, 李柏生, 谭海芳, 等. 广东省肇庆市肺炎克雷伯菌临床分离株的耐药性与 MLST 分型研究[J]. 中国抗生素杂志, 2019, 44(2): 260-265.

[10] 卢鸿, 张亚培, 毕文姿, 等. 广泛耐药肺炎克雷伯菌生物膜形成能力及毒力基因相关分析[J]. 临床检验杂志, 2016, 34(6): 436-439.

[11] HUANG S H, WANG C K, PENG H L, et al. Role of the small RNA RyhB in the fur regulon in mediating the capsular polysaccharide biosynthesis and iron acquisition systems in *Klebsiella pneumoniae*[J]. *BMC Microbiol*, 2012, 12(1): 1-11.

[12] 胡付品, 郭燕, 朱德妹, 等. 2018 年 CHINET 中国细菌耐药性监测[J]. 中国感染与化疗杂志, 2020, 20(1): 1-10.

[13] 白冰, 林志伟, 徐广健, 等. 卡泊芬净对粪肠球菌生物膜形成能力影响的初步研究[J]. 中国感染控制杂志, 2019, 18(7): 607-611.

[14] 彭蓉蓉, 孔晓明, 周翔. 肺炎克雷伯菌形成生物膜菌株的基因型检测及其耐药探析[J]. 临床输血与检验, 2017, 19(5): 456-459.

[15] DAVIDO B, TRUCHIS P D, LAWRENCE C, et al. Extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* versus *Klebsiella pneumoniae*: does type of germ really matter[J]. *Infect Control Hosp Epidemiol*, 2018, 39(9): 1137-1138.

[16] MARS R A T, NICOLAS P, DENHAM E L, et al. Regulatory RNAs in *Bacillus subtilis*: a gram-positive perspective on bacterial rna-mediated regulation of gene expression[J]. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2016, 80(4): 1029-1057.

[17] SINHA D, MATZ L M, CAMERON T A et al. Poly(A) polymerase is required for RyhB sRNA stability and function in *Escherichia coli*[J]. *RNA*, 2018, 24(11): 1496-1511.

[18] KIM J N, KWON Y M. Genetic and phenotypic characterization of the RyhB regulon in *Salmonella typhimurium* [J]. *Microbiol Res*, 2013, 168(1): 41-49.

(收稿日期: 2020-07-25 修回日期: 2020-12-12)